Standar Nasional Indonesia

SNI 2354-16:2017

Cara uji kimia – Bagian 16: Penentuan kadar *saxitoxin* (*paralytic shellfish poisoning*) dengan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada produk kekerangan

ICS 67.050

Badan Standardisasi Nasional

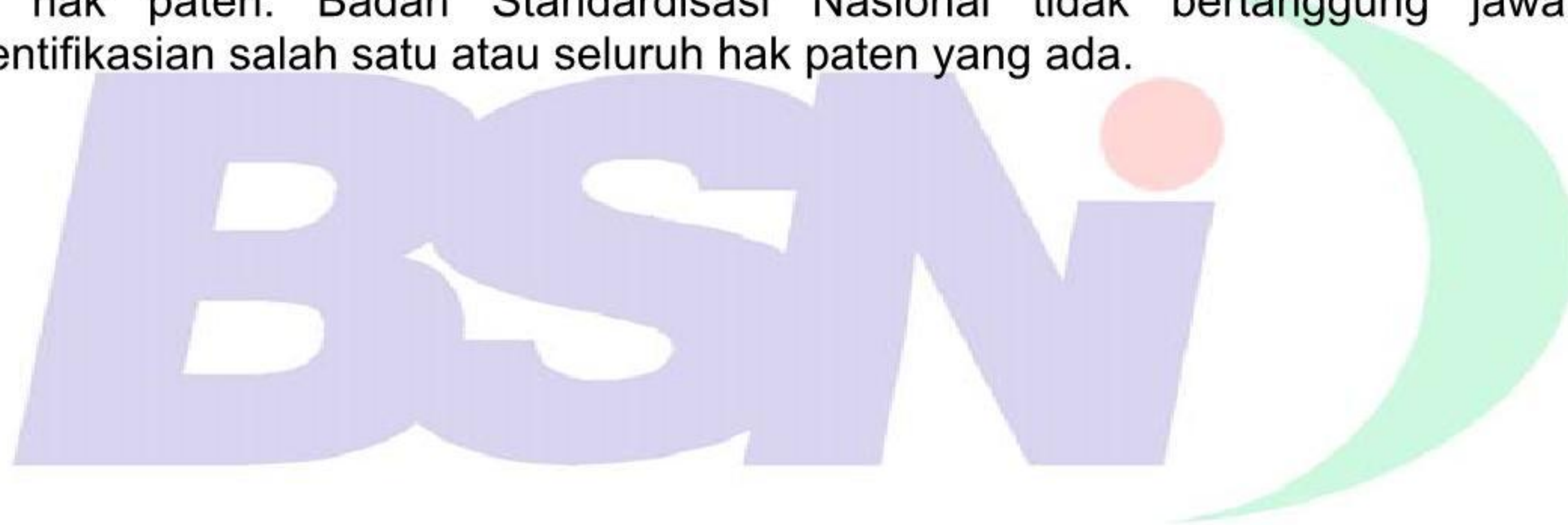
Daftar isi

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) 2354-16:2017 dengan judul *Cara uji kimia – Bagian 16: Penentuan kadar saxitoxin (paralytic shellfish poisoning) dengan metode enzyme linked immunoassay (ELISA) pada produk kekerangan,* disusun dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: *Produk Perikanan*. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disetujui dalam rapat konsensus nasional di Jakarta, pada tanggal 26 – 28 Juli 2017. Konsensus ini dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholder*) terkait, yaitu perwakilan dari produsen, konsumen, pakar dan pemerintah.

Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 26 Agustus 2017 sampai dengan 26 Oktober 2017 dengan hasil akhir disetujui menjadi Rancangan Akhir Standar Nasional Indonesia (RASNI).

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari dokumen standar ini dapat berupa hak paten. Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab untuk pengidentifikasian salah satu atau seluruh hak paten yang ada.

Pendahuluan

Dalam penyusunan SNI ini telah memperhatikan ketentuan yang terdapat dalam:

1. Undang-Undang Nomor 31 Tahun 2004 tentang Perikanan, yang telah diamandemen dengan Undang-Undang Nomor 45 Tahun 2009 tentang Perikanan.
2. Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 2015 tentang Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan serta Peningkatan Nilai Tambah Produk Hasil Perikanan.
3. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor 72/PERMEN-KP/2016 tentang Persyaratan dan Tata Cara Penerbitan Sertifikat Kelayakan Pengolahan.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor 52A/KEPMEN-KP/2013 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Cara uji kimia – Bagian 16: Penentuan kadar *saxitoxin* (*paralytic shellfish poisoning*) dengan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada produk kekerangan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan cara uji penapisan (*screening test*) yang digunakan untuk menentukan kadar *saxitoxin* pada produk kekerangan.

2 Istilah dan definisi

2.1
absorbansi
penyerapan cahaya oleh partikel dalam suatu larutan dalam sistem optik pada spektrofotometer

2.2
***paralytic shellfish poisoning* (PSP)**
keracunan yang disebabkan oleh *saxitoxin* yang menyerang sistem syaraf dan melumpuhkan otot-otot manusia

2.3
antibodi
molekul imunoglobulin yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintetis molekul ini di dalam jaringan limfoid (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut

2.4
antigen
benda asing yang menyebabkan pembentukan antibodi bila dimasukkan ke dalam organisme. Antigen bisa berupa toksin dari bakteri, enzim, protein hewani dan nabati lain, atau sel nabati dan hewani

2.5
saxitoxin
merupakan salah satu toksin yang berperan dalam *Paralytic Shellfish Poisoning* dan berasal dari plankton diatom *Pyrodinium bahamense, Alexandrium* spp., dan *Gymnodinium* spp.

2.6
faktor pengenceran
bilangan yang menunjukkan rasio antara volume larutan akhir terhadap volume awal

2.7
ekstraksi
proses pemisahan senyawa diantara dua fase zat yang tidak bercampur menggunakan pelarut

2.8
enzim
protein yang bertindak sebagai katalis biologis dan berfungsi untuk mempercepat reaksi kimia di dalam jaringan organisme

2.9
***enzyme linked immunoassay* (ELISA)**
teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu antibodi maupun antigen pada suatu contoh

2.10
inkubasi
pengkondisian campuran reaksi dalam lingkungan suhu yang sesuai dan konstan selama kurun waktu tertentu

2.11
sentrifus
alat untuk memisahkan dan atau mengendapkan campuran dua fase atau lebih dengan pemutaran pada kecepatan tinggi

2.12
lubang sumuran
lubang sumuran pada microtiter plate yang berisi antigen

3 Prinsip

Metode ini berdasarkan pengujian ELISA kompetitif untuk mendeteksi *saxitoxin* (PSP) yang terdapat pada kekerangan. Antibodi anti *saxitoxin* (PSP) dilapiskan pada lubang sumuran di *microtiter plate*. Selama analisa berlangsung, contoh ditambahkan bersamaan dengan *saxitoxin-horseradish peroxidase* (*saxitoxin*-HRP) *conjugated*. *Saxitoxin* (PSP) yang terdapat pada contoh akan berkompetisi mengikat antibodi *saxitoxin* (PSP), dengan cara demikian akan melindungi *saxitoxin* (PSP)-HRP dari ikatan antibodi yang menempel pada sumuran. Setelah ditambahkan *saxitoxin* (PSP) *substrat* (TMB) akan terbentuk perubahan warna. Intensitas warna yang dihasilkan akan berbanding terbalik dengan konsentrasi *saxitoxin* (PSP) di dalam contoh.

4 Peralatan

a) *Blender*;
b) *Erlenmeyer*;
c) *Incubator*;
d) *Freezer*;
e) *Micropipette* (20 µl sampai dengan 200 µl dan 200 µl sampai dengan 1000 µl);
f) *Micropipette multichannel* (50 µl sampai dengan 300 µl);
g) *Microtiter plate reader*/ELISA *reader* (450 nm/630 nm);
h) Pipet volumetrik;
i) Sentrifus;
j) *Shaker*;
k) Tabung sentrifus;
l) Timbangan analitik;
m) Penangas air (*Waterbath*).

5 Bahan

5.1 Bahan kimia

a) Akuabides;

b) Metanol.

5.2 Bahan ELISA kits

a) *Saxitoxin* (PSP) *antibody coated plate*;
b) *Saxitoxin* (PSP)-HRP *conjugated*;
c) *10x* sample *extraction buffer*;
d) *20x wash solution*;
e) Larutan standar *saxitoxin* (PSP)
f) *Stop buffer*;
g) TMB (3,3',5,5'-*tetramethyl benzidine*) substrat;
h) Anti-*saxitoxin* (PSP) *antibody.*

6 Prosedur kerja

6.1 Preparasi contoh daging kekerangan

a) Pisahkan daging kekerangan dari cangkangnya, cuci dengan akuabides dan tiriskan;
b) Lumatkan contoh (± 250 gram) dengan blender hingga homogen;
c) Simpan contoh yang telah homogen pada wadah yang bersih dan tertutup;
d) Jika contoh tidak langsung diuji maka simpan dalam freezer sampai waktu analisa dilakukan. Apabila terjadi pemisahan antara padatan dan cairan dalam lumatan contoh maka dilakukan pengadukan ulang sebelum dilakukan penimbangan.

6.2 Ekstraksi

a) Timbang dengan saksama daging sebanyak 0,5 gram, tambahkan 1 mL 50 % metanol air dan *vortex* selama 5 menit dengan kecepatan maksimum;

b) Sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4.000 rpm;

c) Pindahkan 0,1 mL supernatan (lapisan atas) kedalam tabung sentrifus baru;

d) Tambahkan 1,9 mL *1x extraction buffer* /metanol (90/10).

6.3 Proses pengujian ELISA

a) Masukkan 50 µL masing-masing larutan standar *saxitoxin* (PSP) ke dalam beberapa lubang sumuran (duplo), susunan larutan standar dimulai dari konsentrasi terendah sampai konsentrasi tertinggi;

b) Masukkan 50 µL masing-masing ekstrak sampel ke dalam lubang sumuran yang berbeda (duplo);

c) Tambahkan 50 µL *saxitoxin* (PSP)-HRP *conjugated* kedalam setiap lubang sumuran;

d) Tambahkan 50 µL anti-*saxitoxin* (PSP) antibodi kedalam setiap lubang sumuran dan campurkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual selama 1 menit;

e) Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup dan gelap selama 30 menit pada suhu 20 °C - 25 °C;

f) Cuci lubang sumuran dengan 250 µL *1x wash solution* sebanyak tiga kali;

g) Setelah pencucian terakhir, balikkan *microtiter plate* dan ketukkan pada alas yang dilapisi oleh kertas tisu serta jangan biarkan *microtiter plate* mengering;

h) Tambahkan 100 µL TMB *substrate* dan goyangkan *microtiter plate* secara perlahan selama 1 menit;

i) Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup dan gelap selama 15 menit pada suhu 20 °C - 25 °C;

j) Tambahkan 100 µL *stop buffer* untuk menghentikan reaksi enzim;

k) Baca segera *absorbansi* setiap sumuran dengan *microtiter plate reader* (ELISA *reader*) pada panjang gelombang 450 nm.

7 Perhitungan hasil

a) Kurva kalibrasi standar *saxitoxin* (PSP) dapat dibuat dari pembacaan prosentase absorbansi setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/ml pada kurva ln.

$$\frac{B}{Bo}\% = \frac{Absorbansi\ standar\ atau\ contoh}{Absorbansi\ standar\ 0\ ng/ml} \times 100\% \quad (1)$$

b) Masukkan hasil pembacaan prosentase (%) absorbansi contoh ke dalam kurva kalibrasi standar.

c) Nilai konsentrasi *saxitoxin* (PSP) pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai ng/g setelah dikalikan faktor pengenceran 60.

8 Pelaporan

a) Jika diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan turun, tapi lebih dari 5 (lima) pembulatan naik.

CONTOH : 14,454 dibulatkan menjadi 14,45
14,466 dibulatkan menjadi 14,47

b) Jika diperoleh angka desimal 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi bila angka didepannya ganjil maka pembulatan akan naik.

CONTOH : 14,765 dibulatkan menjadi 14,76
14,475 dibulatkan menjadi 14,48

9 Keamanan dan keselamatan

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama analisa maka perlu diperhatikan hal-hal berikut:

a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa.

b) Gunakan jas laboratorium dan masker selama bekerja.

c) Untuk menjaga kesehatan (mengantisipasi toksisitas) analis diperlukan minum susu tiap hari.

10 Pengendalian mutu

Pengendalian mutu yang digunakan dengan persyaratan sebagai berikut:

- Bahan kimia berkualitas murni (*Grade Reagent* – GR).

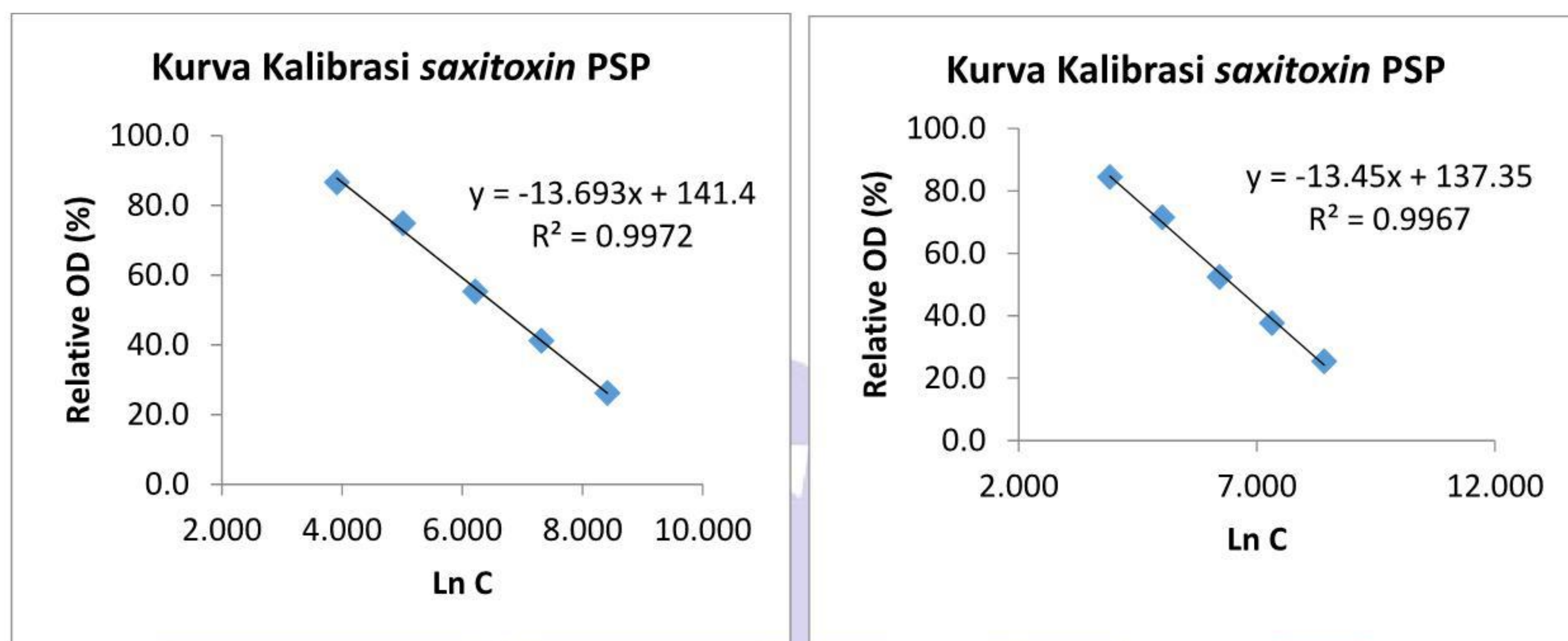
- Alat gelas bebas kontaminasi.
- Alat ukur yang telah terkalibrasi.
- Penyimpanan ELISA kit pada lemari pendingin dengan suhu 2 °C sampai dengan 8 °C.
- Kondisikan ELISA kit pada suhu kamar selama 30 menit sampai dengan 1 jam sebelum digunakan.
- Gunakan bahan analisa sebelum batas waktu kadaluarsa.
- Syarat keberterimaan kuantifikasi hasil uji harus memenuhi syarat *recovery* 80 % - 110 %.

Lampiran A

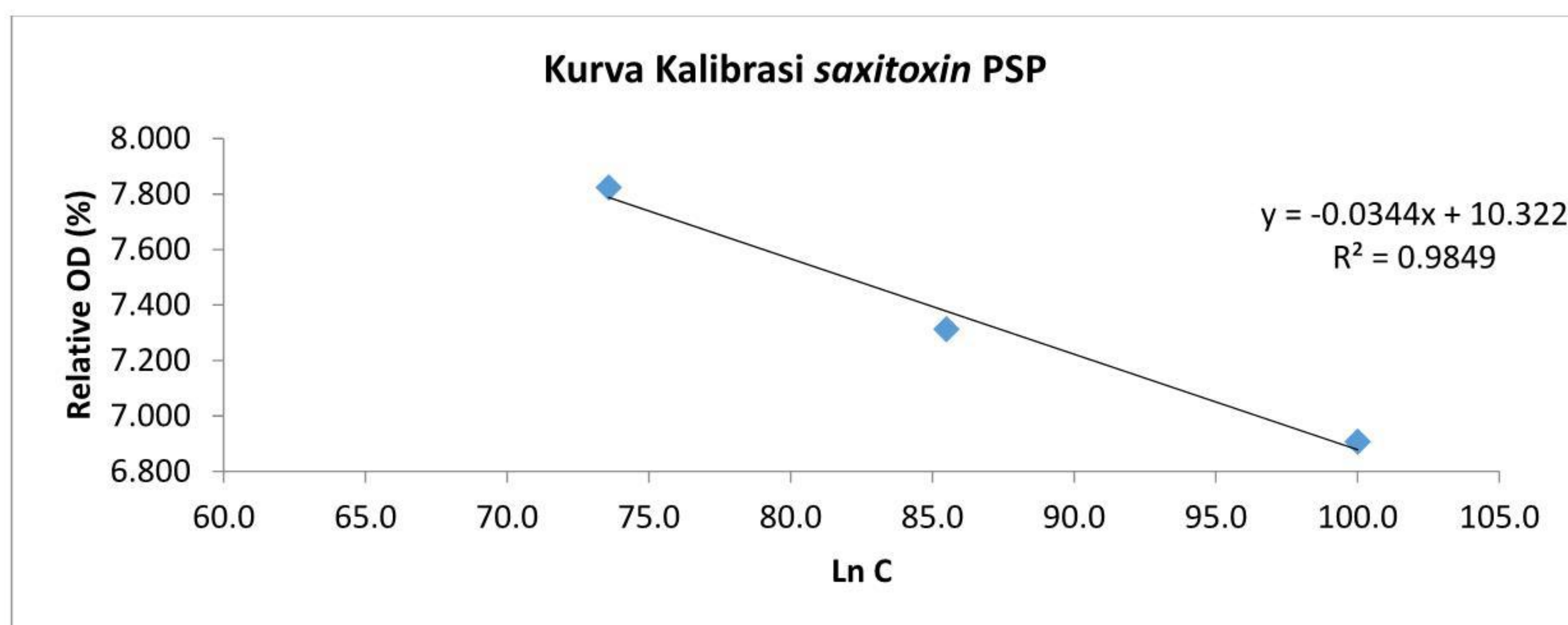
(informatif)

Data verifikasi penentuan kadar *saxitoxin* (PSP)

A.1 Uji linearitas

Uji linieritas dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi dari larutan standar kerja *saxitoxin* (PSP):
0,0; 0,05; 0,15; 0.50; 1,50 dan 4,50 ng/ml, nilai koefisien regresi yang didapat adalah 0,9972 dan 0,9967.

Gambar A.1 – Kurva kalibrasi larutan standar kerja *saxitoxin* (PSP)

A.2 Uji linearitas *spike* contoh

Uji linieritas *spike* contoh dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi dari 3 larutan *spike* contoh, yaitu 1,0; 1,50 dan 2,50 ng/ml, nilai koefisien regresi yang didapat adalah 0,9849.

Gambar A.2 – Kurva kalibrasi larutan *spike* contoh

A.3 Uji batas deteksi *saxitoxin* (PSP)

Pengujian blanko sepuluh kali ulangan menghasilkan rata-rata konsentrasi 6,507 ng/g dengan SD 0,38 ng/g. Dari data tersebut maka dapat ditentukan batas deteksi (LoD = 7,198 ng/g) dan batas determinasi (LoQ = 8,338 ng/g).

Tabel A.1 - Rekapitulasi *Optical Density* (OD) dan konsentrasi *blank* sampel

Ulangan	OD *blank* Sampel	Konsentrasi (ng/g)
1	1,882	5,910
2	1,866	6,270
3	1,897	5,580
4	1,897	5,580
5	1,864	6,320
6	1,905	5,410
7	1,868	6,230
8	1,859	6,440
9	1,864	6,320
10	1,856	6,510
Rata2	**1,883**	**6,057**
SD	**0,017**	**0,380**
%RSD	**0,907**	**6,277**

LOD = 7,198 ng/g

LOQ = 8,338 ng/g

LOD = Konsentrasi rata – rata (C) + 3 Standar Deviasi
LOQ = Konsentrasi rata – rata (C) + 6 Standar Deviasi

A.4 Uji presisi dan *recovery saxitoxin* (PSP)

A.4.1 *Spiked* contoh 50 ng/g

Uji *recovery* dengan menguji blanko sampel yang telah di*spike* larutan standar *saxitoxin* PSP pada 0,5 g contoh kekerangan dengan konsentrasi 50 ng/ml sebanyak 33 µl, nilai konsentrasi *spike* 50 ng/g (ppb) dilakukan 7 ulangan.

Tabel A.2 - Rekapitulasi *Optical Density* (OD) dan konsentrasi *saxitoxin* (PSP) 50 ng/g

			Rata-rata Blanko	6,06	
Ulangan	***Absorbansi* (Abs)**	***Spiked* @ (ng/g)**	**Kons. Terukur (ng/g)**	**Kons. Terkoreksi (ng/g)**	***Recovery* (%)**
1	1,067	50	55,130	49,073	98,1
2	1,066	50	55,300	49,243	98,5
3	1,062	50	55,990	49,933	99,9
4	1,066	50	55,300	49,243	98,5
5	1,050	50	58,130	52,073	104,1

Tabel A.2 – lanjutan

Ulangan	*Absorbansi (Abs)*	*Spiked @* (ng/g)	Kons. Terukur (ng/g)	Kons. Terkoreksi (ng/g)	*Recovery (%)*
6	1,063	50	55,820	49,763	99,5
7	1,058	50	56,690	50,633	101,3
Rata2	**1,062**		**56,051**	**49,994**	**100,0**
SD	**0,006**		**1,06**	**1,06**	**2,1**
%RSD	**0,567**		**1,9**	**2,1**	**2,1**

Diperoleh hasil rata-rata 49,99 ng/g bila dibagi dengan nilai konsentrasi *spike* 50 ng/g maka *recovery* yang diperoleh sebesar 99,6 % yang berarti masih masuk dalam persyaratan *recovery* 80 % - 110 %.

A.4.2 *Spiked* contoh 100 ng/g

Uji *recovery* dengan menguji blanko sampel yang telah di*spike* larutan standar *saxitoxin* (PSP) pada 0,5 g contoh kekerangan dengan konsentrasi 50 ng/ml sebanyak 67 µl, nilai konsentrasi spike 100 ng/g (ppb) dilakukan 7 ulangan.

Tabel A.3 - Rekapitulasi *Optical Density* (OD) dan konsentrasi *saxitoxin* (PSP) 100 ng/g

Ulangan	*Absorbansi (Abs)*	*Spiked @* (ng/g)	Kons. Terukur (ng/g)	Kons. Terkoreksi (ng/g)	*Recovery (%)*
1	0,911	100	92,260	86,203	86,2
2	0,915	100	90,980	84,923	84,9
3	0,912	100	91,940	85,883	85,9
4	0,908	100	93,240	87,183	87,2
5	0,911	100	92,260	86,203	86,2
6	0,909	100	92,920	86,863	86,9
7	0,916	100	90,660	84,603	84,6
Rata2	**0,912**		**92,037**	**85,980**	**86,0**
SD	**0,003**		**0,94**	**0,94**	**0,9**
%RSD	**0,321**		**1,0**	**1,1**	**1,1**

Diperoleh hasil rata-rata 85,980 ng/g bila dibagi dengan nilai konsentrasi spike 100 ng/g maka *recovery* yang diperoleh sebesar 86 % yang berarti masih masuk dalam persyaratan *recovery* 80 % - 110 %.

A.4.3 *Spiked* contoh 150 ng/g

Uji *recovery* dengan menguji blanko sampel yang telah di*spike* larutan standar *saxitoxin* (PSP) pada 0,5 g contoh kekerangan dengan konsentrasi 50 ng/ml sebanyak 100 µl, nilai konsentrasi spike 150 ng/g (ppb) dilakukan 7 ulangan.

Tabel A.4 - Rekapitulasi *Optical Density* (OD) dan konsentrasi *saxitoxin* (PSP) 150 ng/g

Ulangan	*Absorbansi (Abs)*	*Spiked @ (ng/g)*	Kons. Terukur (ng/g)	Kons. Terkoreksi (ng/g)	*Recovery (%)*
1	0,773	150	152,860	146,803	97,9
2	0,792	150	142,350	136,293	90,9
3	0,786	150	145,580	139,523	93,0
4	0,792	150	142,350	136,293	90,9
5	0,786	150	145,580	139,523	93,0
6	0,780	150	148,890	142,833	95,2
7	0,784	150	146,680	140,623	93,7
Rata2	**0,785**		**146,327**	**140,270**	**93,5**
SD	**0,007**		**3,70**	**3,70**	**2,5**
%RSD	**0,854**		**2,528**	**2,637**	**2,6**

Diperoleh hasil rata-rata 140,270 ng/g bila dibagi dengan nilai konsentrasi spike 150 ng/g maka *recovery* yang diperoleh sebesar 93,5 % yang berarti masih masuk dalam persyaratan *recovery* 80 % - 110 %.

A.5 Ringkasan hasil validasi

Tabel A.5 - Ringkasan hasil validasi

Karakteristik validasi	Matriks	Hasil	Syarat keberterimaan	Referensi	Kesimpulan
% *Recovery*	Spike 50 ng/g	99,6 %	(80-110) %	CD 2002/657/EC	Memenuhi
	Spike 100 ng/g	86,0 %	(80-110) %	CD 2002/657/EC	Memenuhi
	Spike 150 ng/g	93,5 %	(80-110) %	CD 2002/657/EC	Memenuhi
Presisi (% RSD)	Spike 50 ng/g	2,1	25,12	CV Horwitz	Memenuhi
	Spike 100 ng/g	1,1	22,63	CV Horwitz	Memenuhi
	Spike 150 ng/g	2,6	21,29	CV Horwitz	Memenuhi
LoD	Kerang	7,19 ng/g	< 800 ng/g	Eurachem	Memenuhi
LoQ	Kerang	8,34 ng/g	< 800 ng/g	Eurachem	Memenuhi

Bibliografi

[1] Anonimous. 2011. Reaksi antigen-antibodi dan prinsip pengobatan.

[2] EFSA (European Food Safety Association) Journal 2010,"Scientific opinion on marine biotoxins emerging toxins: Saxitoxin".

[3] FAO (Food and Agriculture Organization) journal: Paralytic Shellfish Poisoning.

[4] FDA (Food and Drug Administration), Chapter 6. Guidance natural toxin.

[5] Motohiro T. 1992. Biotoxin in seafood in quality assurance in the fish industry, edited by Huss HH, et all. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo.[6] Regulation (EC) No.853/2004 of The European Parliament and of The Council "Laying down spesific hygiene rules for food of animal origin".

[7] Saxitoxin (PSP) ELISA test kit manual.

Informasi pendukung terkait perumus standar

[1] Komite Teknis Perumus SNI

Komite Teknis 65-05 Produk Perikanan

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis perumus SNI

Ketua	:	Innes Rahmania	Kementerian Kelautan dan Perikanan
Sekretaris	:	Simson Masengi	Kementerian Kelautan dan Perikanan
Anggota	:	Nurjanah	Yayasan Lembaga Konsumen Indonesia (YLKI)
		Lili Defi Z.	Badan Pengawas Obat dan Makanan
		Darmadi Marpauli	PT Citra Dimensi Arthali
		Hantowo Tjhia	Asosiasi Pengusaha Pengolahan dan Pemasaran Produk Perikanan Indonesia (AP5I)
		Murtiningsih	Kementerian Kelautan dan Perikanan
		Bagus S. B. Utomo	Kementerian Kelautan dan Perikanan
		Tengku A.R Hanafiah	Masyarakat Standardisasi (MASTAN)
		Ahmad M. Mutaqin	Kementerian Kelautan dan Perikanan
		Harsi D. Kusumaningrum	Institut Pertanian Bogor
		Adi Surya	Asosiasi Pengalengan Ikan Indonesia (APIKI)
		Tri Winarni Agustini	Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia (MPHPI)
		Santoso	Sekolah Tinggi Perikanan
		Mufidah Fitriati	Komisi Laboratorium Pengujian Pangan Indonesia

[3] Konseptor rancangan SNI

1. Iswadi Idris - Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM), BKIPM - KKP

2. Hutomo Widiatmodjo - Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM), BKIPM - KKP

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis perumus SNI

Direktorat Pengolahan dan Bina Mutu
Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan
Kementerian Kelautan dan Perikanan